

原著 2

炎症性サイトカイン過剰産生ヒト胸腺癌細胞株 (ThyL-6) における
Flavopiridolによる転写阻害を介したIL-6分泌抑制高木 和貴¹⁾ 稲井 邦博²⁾ 内木延宏²⁾
岩崎 博道¹⁾ 上田 孝典¹⁾

背 景

Interleukin-6 (IL-6) は *de novo* 急性炎症反応における重要なメディエーターとして産生され、細胞受容体に結合すると核内に伝達し転写因子を活性化する。近年IL-6受容体抗体等生物学的製剤が登場し、関節リウマチ患者にも約3割程度に寛解を得ることが可能になった。Flavopiridolは *Dysoxylum binectariferum* より抽出されるフラボノイド成分由来の半合成のフラボン誘導体である。Flavopiridolは殆どのcyclin-dependent kinases (CDK) に対する阻害作用により、転写レベルに於いてRNA polymerase IIのリン酸化を阻害し、細胞の転写活性を抑制する事が近年明らかにされつつある。

目 的

IL-6を含む炎症性サイトカイン産生細胞株を用いて、FlavopiridolがIL-6産生を転写レベルで阻害することにより、関節リウマチなど炎症性疾患に対する新規分子標的薬となりうるか検討する。

方 法

高熱・白血球増加・血清IL-6値の高値・尿酸排泄亢進による低尿酸血症が見られる57歳胸腺癌患者から我々が樹立したThyL-6細胞株について、サイトカイン抗体アレイにて細胞が分泌するサイトカインをスクリーニングした。 *In vitro* において細胞にFlavopiridolを添加し、western blot法にてRNA polymerase IIの発現を観察した。

結 果

ThyL-6細胞が分泌しているサイトカインとしてIL-6に加え、IL-8、VEGF、TNF α 、IL-1 α 、RANTESが検出された。IL-6については、細胞に1nMから100nM Flavopiridolを4時間添加すると、濃度依存性に培養上清中IL-6濃度が減少した。Western blot法による検討ではFlavopiridol投与により濃度依存性にIL-6の発現が抑制され、時間・濃度依存性にRNA polymerase IIのdegradationが見られた。

結 論

Flavopiridolは転写阻害によりIL-6産生細胞でのIL-6産生を抑制した。FlavopiridolがCDKを標的としたIL-6産生抑制による新規分子標的療法として、関節リウマチなど炎症性疾患に対治療戦略になりうる可能性が示唆された。

はじめに

関節リウマチなどの炎症性疾患、重症細菌感染症などによる発熱時では産生・惹起された炎症性サイトカインが病因病態形成上、重要な役割を占めている¹⁾。特に敗血症など重症感染症に罹患した患者では、炎症性サイトカイン血症²⁾ から播種性血管内凝固、多臓器障害など不可逆的な病態を来しうるため、感染症など原因治療に並行して高サイトカイン血症に対するステロイドパルス療法や吸着療法³⁾ が必要になる場合がある。

受付：2010年9月8日，受理：2010年11月25日

1) 福井大学医学部 血液腫瘍内科 Kazutaka Takagi, Hiromichi Iwasaki, Takanori Ueda

2) 福井大学医学部 分子病理学 Kunihiro Inai, Nobuhiro Naiki

Key words : Flavopiridol, 炎症性サイトカイン, IL-6, RNA polymerase II

Interleukin-6 (IL-6) は *de novo* 急性炎症反応における重要なメディエーターとして産生され、肝臓のIL-6受容体に結合しgp130とオリゴマー複合体を形成する (図1)。さらにシグナルがJAK/Tyk キナーゼ, STAT3を介して核内に伝達

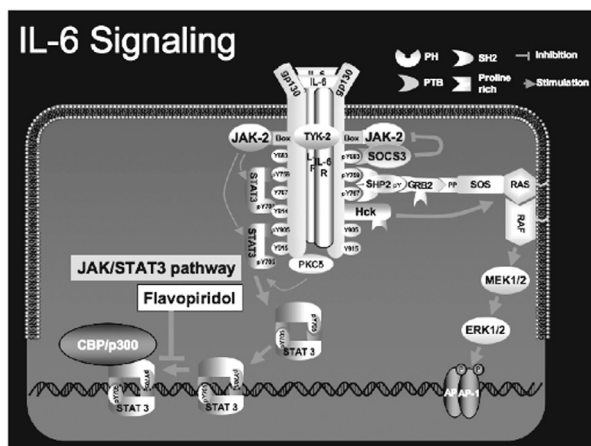


図1 IL-6シグナル伝達

我々の樹立したThyL-6細胞は炎症性サイトカインを分泌し、自己分泌されたIL-6により増殖する。IL-6は細胞膜IL-6受容体に結合しgp130とオリゴマー複合体を形成する。さらにシグナルがJAK/Tyk kinases, STAT3を介して核内に伝達し転写因子を活性化する。FlavopiridolはRNA pol II阻害により転写を阻害する。

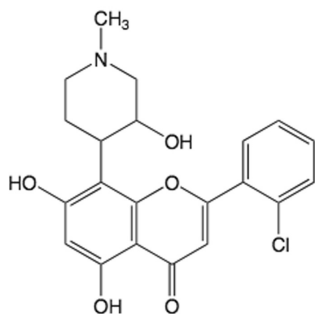


図2 Flavopiridolの分子構造

構造式名, (-)-2-(2-Chlorophenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(3R,4S)-3-hydroxy-1-methyl-4-piperidinyl]-4h-1-benzopyran-4-one hydrochloride. マホガニー科 *Dysoxylum binectariferum* という木皮から発見され、分子構造をヒントに合成されたフラボノイド。

し転写因子を活性化することが知られている^{4,5)}。また多発性骨髄腫など一部の悪性腫瘍において、自己分泌も含めたIL-6依存性の細胞増殖が知られている⁶⁻⁸⁾。近年関節リウマチの臨床に於いて抗IL-6受容体抗体やTNF- α 阻害剤などいわゆる生物学的製剤が登場し、関節リウマチ患者にも約3割程度に寛解を得ることが可能になってきた⁹⁾。現在使用可能な生物学的製剤である抗TNF- α 単クローン性抗体・可溶性TNF受容体や抗IL-6受容体抗体は、滑膜マクロファージや線維芽細胞の活性化に重要なTNF- α やIL-6の作用を直接抑制することで滑膜や線維芽細胞の増殖を抑制する。

Flavopiridol (図2) は熱帯・亜熱帯に生息するMahogany科に属する植物の木皮である *Dysoxylum binectariferum* (中国では「葱臭木」) より抽出されるフラボノイド成分から人工的に合成された半合成のフラボン誘導体である。Flavopiridolはcyclin-dependent kinase (CDK) のATP結合部位に結合し、低濃度で殆どのCDKに対して高い阻害効果を示す^{10,11)}。単剤での臨床試験 (phase II) ではCDK inhibitorとして転移性悪性黒色腫¹²⁾、子宮体癌¹³⁾、多発性骨髄腫¹⁴⁾に対する臨床試験が行われたが効果は不十分で¹⁴⁾、強い骨髄毒性以外に非血液毒性として下痢が見られた。Flavopiridolは現在慢性リンパ性白血病¹⁵⁾や、ハイリスク急性骨髄性白血病に対して、araC等との併用療法として臨床治験が行われている¹⁶⁾。

Flavopiridolは細胞内転写レベルに於いて、CDK阻害を介してRNA polymerase IIのリン酸化を阻害し転写活性を抑制する事が近年明らかにされている¹⁶⁾。Flavopiridolのターゲットであるcyclin H-CDK7は、CDK-activating kinase (CAK) 活性を持っている他にRNA polymerase II (pol II) のCOOH-terminal domain (CTD) アミノ酸配列Y¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷の52回繰り返し構造のうち、5番目のセリン (S⁵) をリン酸化することによりRNA pol IIの転写開始を促進する活性を持つ¹⁷⁾。また同様にFlavopiridolのターゲットであるcyclin T-CDK9は、RNA pol II CTDの2番目セリン (S²) をリン酸化することによりRNA pol IIの転写伸長を促進する。Houらは肝癌細胞 (HepG2) を用いて

Flavopiridolが細胞のIL-6産生を転写レベルで産生阻害することにより抗炎症作用を発揮し得ることを示した¹⁸⁾。さらにFlavopiridolがvascular endothelial growth factor (VEGF) 蛋白の発現を抑制することも示されている¹⁹⁾。我々はIL-6等多様な炎症性サイトカインを過剰産生するヒト胸腺癌細胞株 (ThyL-6) を樹立した²⁰⁾。今回我々はThyL-6細胞株を用いてFlavopiridolがIL-6産生を抑制することを示し、関節リウマチなど炎症性疾患に対する免疫抑制薬としての分子標的療法薬に成りうる可能性が示唆されたので報告する。

方 法

試薬：Flavopiridol hydrochloride, 2-(2-Chlorophenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(3R,4S)-3-hydroxy-1-methyl-4-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride (Sigma, St. Louis, MO), RPMI1640培地, 牛胎児血清 (FBS), 10% trypsin-EDTA, MTT assay kit (以上Sigma), TranSignal Human Cytokine Antibody Array 3.0 kit (Panomics, Redwood City, CA), ヒト遺伝子組み換えIL-6 (分子量約24kD), IL-8, RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) (以上PeproTech EC, London, UK), ウサギ多クローン抗ヒトIL-6抗体, マウスモノクローナル抗ヒトIL-8抗体, ヤギ多クローン抗ヒトRANTES抗体 (以上Sigma), RNA polymerase II (pol II) (N-20), phospho-Ser⁵ Pol II (clone 8A7) (以上Santa Cruz Biotechnology Inc., CA), phospho-Ser² Pol II (ab5095) (Abcam, Cambridge, MA), HRP結合二次抗体 (Santa Cruz, CA)。

ThyL-6細胞の樹立：57歳男性。持続する高熱を主訴として福井大学医学部附属病院血液腫瘍内科に紹介初診となった。CT等にて縦隔腫瘍と鎖骨上リンパ節腫脹を認め、生検にて胸腺癌と診断した。38℃以上の高熱の持続と白血球増加、血清CRP高値、血清IL-6値の高値、血清尿酸値1.7 mg/dl、尿酸クリアランス18.2 mL/minと著しい尿酸排泄亢進による低尿酸血症を呈していた。

患者胸水から採取した胸腺癌細胞を10%FBS添加RPMI1640培地 (100 U/ml ペニシリン, 100 ug/ml ストレプトマイシン含有) を用いて37℃, 5%CO₂条件下で継代培養し、細胞株 (ThyL-6細胞) として樹立した²⁰⁾。実験には対数増殖期の細胞を用いた。細胞培養上清中のサイトカイン分泌の定量は細胞増殖がconfluentとなった時期の培養上清を採取し、測定まで-80℃で保存した。

Western blot法：細胞から抽出した蛋白と等量の2x SDS-PAGE sample buffer (100mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% Glycerol, 20% β -mercaptoethanol and 0.02% Bromophenol blue) を準備し、SDS-PAGEゲル (7%, 10% or 15%) に添加し泳動した。ゲル内に分画された蛋白は Immobilon-P 0.45 μ m PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA) に転写し、抗体とTBS-T (25 mM Tris, 130mM NaCl, pH 8.4, 5 mM リン酸2水素カリウム, 5%ドライミルク, 0.1% Tween 20) を用いて培養した。

サイトカイン抗体アレイ解析：サイトカイン抗体アレイ (TranSignal Human Cytokine Antibody Array 3.0 kit : Panomics, Fremont, CA) を用いて、細胞が分泌するサイトカインプロファイルをスクリーニングした。2mLの対数増殖期細胞培養上清中にメンブレンを室温で2時間培養した。メンブレンに二次抗体処理してサイトカインをChemiluminescence Image Analyzer (Alpha Innotech, San Leandro, CA) にて可視化した。

統計処理：図4, 図5におけるデータ群間の検定は、ANOVA分散分析と多重比較のpost hoc検定をStatView 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いて行った。

結 果

ThyL-6細胞のcharacterization. 患者胸水から採取した胸腺癌細胞を継代培養しThyL-6細胞を樹立した²⁰⁾。免疫染色による検討ではThyL-6細胞では上皮系のマーカーが発現し、リンパ球系のマ

Antigen	Specificity	ThyL-6
Pan-Cytokeratin	Epithelial cells	++
Cytokeratin 5/6	Epithelial cells	++
Cytokeratin 7	Epithelial cells	++
Cytokeratin 8	Epithelial cells	+
Cytokeratin 10	Epithelial cells	-
Cytokeratin 18	Epithelial cells	++
Cytokeratin 19	Epithelial cells	++
Cytokeratin 20	Epithelial cells	+
Epithelial Membrane Antigen (EMA)	Epithelial cells	+
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Ductal cells	-
Melanosome	Melanocytes	-
Placental alkaline phosphatase (PLAP)	Placenta	-
S100	Glial cells	-
Vimentin	Mesenchymal cells	+
CD5	T lymphocytes, Thymus	+
CD20cy	B lymphocytes	-
CD30	Ki-1 lymphocytes	-
CD45 (LCA)	Leukocytes	-
CD45R0	T lymphocytes	-
CD117 (c-Kit)	c-Kit	-
Interleukin-6 (IL-6)	IL-6 producing cells	++
Interleukin-8 (IL-8)	IL-8 producing cells	++
Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (RANTES)	Rantes producing cells	++

(+)陽性、(++)強陽性、(-)陰性

表1 ThyL-6細胞の表面抗原 (免疫染色)

ーカーは陰性であった (表1)。G-band分染法では染色体領域7p11, 16q24, 17p11等の異常が見られた。サイトカインアレイを用いて測定したThyL-6細胞が分泌するサイトカインプロファイルを示す (表2)。ThyL-6細胞が分泌しているサイトカインとしてIL-6, IL-8, RANTES, IL-1 α , VEGF, soluble TNF α receptor I, eotoxin, cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA) が検出され, GM-CSF, EGF, MIP1 α , MIP1 β , MIP-4, MIP-5, TGF β , IFN γ , TNFR II, VCAMP-1, IL-1 β , IL-1R α , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6R, IL-10, IL-15, IL-17は検出されなかった (表2)。Western blot法ではThyL-6細胞が分泌するIL-6はヒト遺伝子組み換えIL-6 (PeproTech EC, London,

UK) より若干大きな分子量であった (図3A)。

自己分泌IL-6依存性増殖: ThyL-6細胞培養上清に抗モノクローナルIL-6抗体を投与すると、濃度依存性にThyL-6細胞増殖が抑制され (図3B), ThyL-6細胞増殖は自己分泌IL-6に依存することが示唆された。ThyL-6細胞が分泌するIL-6の生物学的活性の有無を検討するために、培養上清をIL-6依存性に増殖する多発性骨髄腫細胞 (ILKM-3細胞)²¹⁾ に添加した。添加用量依存性にILKM-3細胞増殖を促進した (データ省略)。ThyL-6が分泌するIL-6が生物学的活性を持つことが示唆された。

FlavopiridolによるThyL-6細胞のIL-6分泌抑制: Flavopiridolは細胞CDKを阻害し、転写レベルに於いてRNA polymerase IIのリン酸化を阻害

Apo1/Fas (-)	Leptin (-)	RANTES (+)	ICAM-1 (-)	IL-2 (-)	IL-7 (-)
CTLA (+)	MIP-1 α (-)	TGF β (-)	VCAM-1 (-)	IL-3 (-)	IL-8 (+)
Eotoxin (+)	MIP-1 β (-)	IFN γ (-)	VEGF (+)	IL-4 (-)	IL-10 (-)
GM-CSF (-)	MIP-4 (-)	TNF α (-)	IL-1 α (+)	IL-5 (-)	IL-12 (-)
EGF (-)	MIP-5 (-)	TNF receptor I (+)	IL-1 β (-)	IL-6 (+)	IL-15 (-)
IP-10 (-)	MMP3 (-)	TNF receptor II (-)	L-1 receptor a (-)	L-6 receptor (-)	IL-17 (-)

RANTES, Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted; ICAM, intercellular adhesion molecule; VCAM, vascular cell adhesion molecule; CTLA, cytotoxic T lymphocyte antigen; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TGF, transforming growth factor; IFN, interferon; VEGF, vascular endothelial growth factor; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; TNF, tumor necrosis factor; EGF, Epidermal Growth Factor; IP-10, Interferon gamma-inducible protein 10; MMP, matrix metalloproteinase.

表2 ThyL-6細胞が分泌するサイトカイン

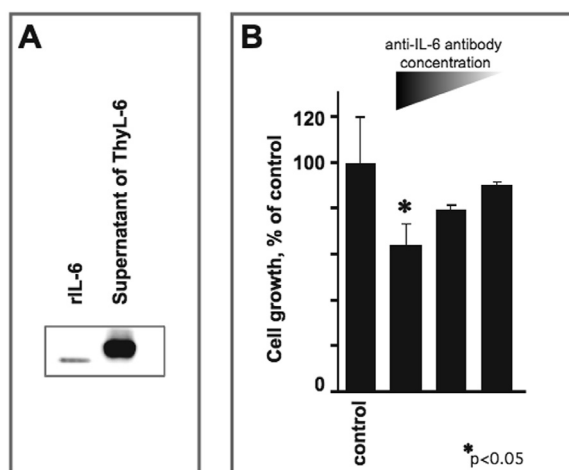


図 3

A) ThyL-6細胞から分泌されたIL-6 (western blot法).

ThyL-6細胞培養上清を直接15% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で泳動し、膜を抗ヒトモノクローナルIL-6抗体で培養した。細胞が分泌する蛋白はヒト遺伝子組み換えIL-6より若干大きい分子量と考えられた。

B) 抗IL-6抗体投与によるThyL-6細胞増殖抑制

96穴プレート培地に 1×10^5 のThyL-6細胞を一晩培養し洗浄した後、10%, 1.0%, もしくは0.1%抗IL-6抗体含有RPMI培地でThyL-6細胞を24時間培養した。培養上清に抗モノクローナルIL-6抗体を投与によりThyL-6細胞の増殖がコントロールと比較して抑制され (MTT assay, $p < 0.05$)、ThyL-6細胞増殖は自己分泌IL-6に依存することが示唆された。

し、細胞蛋白の転写活性を抑制する事が近年明らかにされている²²⁾。FlavopiridolのThyL-6細胞に対する増殖抑制効果は72時間 *in vitro* MTT assayによる IC_{50} 値では 400 ± 10 nMであったが、今回我々は~100 nMのFlavopiridolにおけるThyL-6細胞に対する薬理作用を検討した。これまでの臨床治験に於いて、患者でのFlavopiridolの血中濃度は投与法にもよるが、 $1 \mu M$ 程度まで到達可能であるため¹⁰⁾、今回1nM, 10nM, 100nMで4時間培養した。この濃度条件のFlavopiridol短時間パルス投与により、非投与時と比べて投与量依存性に細胞培養上清中IL-6濃度が抑制された (図4)。

FlavopiridolによるThyL-6細胞転写抑制：
Flavopiridolはcyclin H-CDK7/cyclinT-CDK9を標的

とし、RNA polymerase II (pol II) のCOOH-terminal domain (CTD) リン酸化を阻害する可能性が想定されている¹⁷⁾。ThyL-6細胞に見られたFlavopiridolのRNA pol II 転写阻害活性を検討するために100nM Flavopiridol存在下に4時間培養し、ThyL-6細胞のIL-6もしくはRNA polymerase II (RNA pol II) の発現の変化をwestern blot法で検討した。Flavopiridol投与により濃度依存性にIL-6の発現が抑制され、時間依存性、濃度依存性にRNA pol IIのdegradationが見られた (図5)。RNA pol IIの2つのサブユニット (IIoとIIa)のうち、RNA pol IIのDNAへの結合期 (initiation) サブユニット (IIa) において100nMのFlavopiridol投与により阻害が見られ、伸長期 (elongation) サブユニット (IIo) ではFlavopiridol投与によりdegradationが見られた (図5B)。

考 察

我々は発熱・白血球増加・著しい高CRP血症、そして排泄促進による血漿尿酸値低下を呈した胸腺癌患者からThyL-6細胞を樹立した²⁰⁾。今回行ったサイトカインアレイによるスクリーニングではThyL-6細胞はIL-6等いくつかの炎症性サイトカインを分泌していた。本細胞の増殖は自己が分泌するIL-6にup regulateされていたが (図3)、IL-6以外にもTNF- α やIL-8等いくつかの炎症性サイトカインも高濃度に産生されており、これら他のサイトカインの影響も否定はできない。臨床的にも一部の多発性骨髄腫や悪性リンパ腫細胞に於いて、IL-6依存性に増殖する腫瘍が知られている⁶⁻⁸⁾。Frassanitoらはflowcytometerを用いて多発性骨髄腫患者47人と、本態性M蛋白血症 (MGUS) 患者15人の骨髄腫細胞から分泌されるIL-6量が臨床病期と相関することや、再発難治性細胞が自己分泌IL-6に関連することを示した⁶⁾。これらデータからFlavopiridolによる癌細胞IL-6転写抑制を標的とした治療戦略は、難治性多発性骨髄腫や悪性リンパ腫⁹⁾などIL-6/STAT3経路を耐性機序とした治療抵抗性がん細胞治療に応用できうる可能性も示唆された。しかしIL-6/STAT3経路以外に、低悪性度リンパ腫におけるBcl-2な

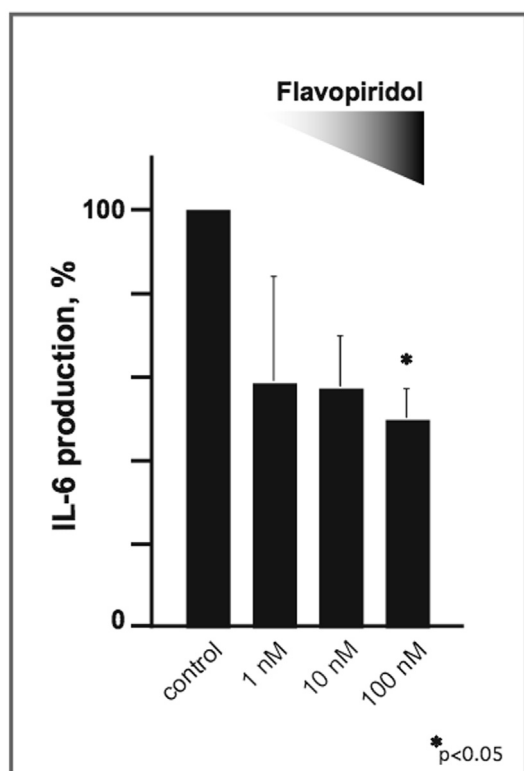


図4 Flavopiridolによる細胞IL-6分泌抑制

ThyL-6細胞(1×10^5)を一晩培養し洗浄した後、図に示した濃度のFlavopiridol含有RPMI培地で4時間培養し、培養液中のIL-6濃度を測定した。100nM Flavopiridol投与により培養上清中へのIL-6分泌がコントロールと比較して抑制された ($p<0.05$)

ど抗アポトーシス蛋白転写抑制の可能性も考えられる⁸⁾。

Flavopiridolはpan CDK inhibitorであり^{16, 23)}, cyclin T-CDK9/cyclin H-CDK7を阻害し、RNA polymerase II (pol II) のCOOH-terminal domain (CTD) アミノ酸配列Y¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷の52回繰り返し構造のうち、S²もしくはS⁵をリン酸化し、RNA pol IIのDNAへの結合 (initiation) と伸長 (elongation) により、転写活性を正に制御する¹⁷⁾。今回血中濃度として到達可能な¹⁰⁾、100nMのFlavopiridol存在下に4時間まで細胞を培養しRNA pol IIa サブユニット優位のdegradationが見られた (図5)。このことはFlavopiridolがRNA pol IIのDNAへの結合 (initiation) 阻害を優位に転写を阻

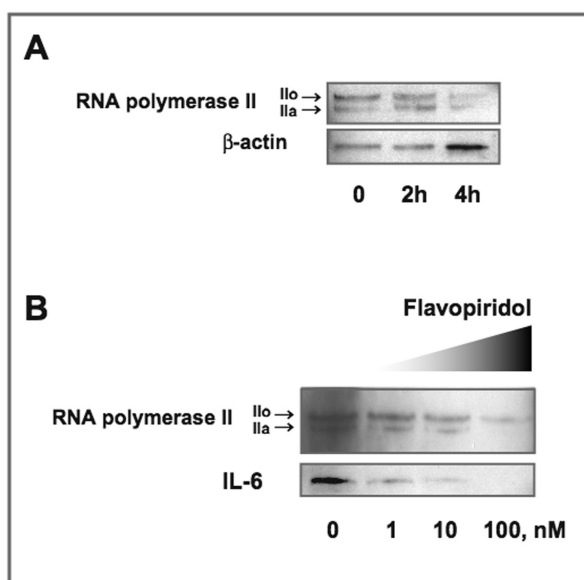


図5 FlavopiridolによるIL-6転写抑制

- A) ThyL-6細胞培養液中に100nM Flavopiridolを投与し4時間培養した後、細胞を採取し細胞RNA polymerase II (RNA pol II) の発現をwestern blotで観察した。上のバンド (Ilo) はリン酸化 RNA pol IIを、下のバンド (Ila) は非リン酸化 RNA pol IIを示す。4時間の薬剤投与によりRNA pol IIのdegradationが見られた。
- B) RNA pol II degradationはFlavopiridol濃度依存性が観察された。

害している可能性が示唆された。1-10 nMという極めて低い濃度の4時間パルス投与でFlavopiridolがThyL-6細胞に於いてIL-6のdegradationを誘導可能であったことは、Flavopiridolが低用量で転写阻害を介したIL-6産生抑制作用を有し、新規抗炎症剤として関節リウマチなど炎症性疾患に有用となりうる可能性が導き出される。関節リウマチなど炎症性疾患に対する抗サイトカイン治療として既にヒト化抗IL-6受容体抗体 (tocilizumab) による優れた関節リウマチ症状改善効果・骨破壊進行抑制効果が得られている²⁴⁾。滑膜マクロファージから分泌されたIL-6が破骨細胞を活性化して骨破壊を増悪させることから、関節リウマチにおいてIL-6産生を制御する必要が

あり, Flavopiridolは低濃度 (～100nM) でIL-6を抑制し関節破壊を抑制する可能性が示唆された。

Sekineらはマウス関節リウマチモデルを用いてFlavopiridolがCDK inhibitionを介する滑膜細胞増殖阻害により組織学的, 臨床的に関節炎症状を改善する事を示した²⁵⁾。Houらは*in vitro*炎症モデルとしてHepG2肝細胞癌細胞においてIL-6により誘導されるCDK9-STAT3複合体を介したγ-フィブリノーゲン遺伝子プロモーター領域へのRNA pol II活性を, Flavopiridol (500nM) が阻害することでFlavopiridolなどCDK9阻害剤が抗炎症作用を持ちうることを示した²⁶⁾。上記報告のいずれも数百nMの濃度でのFlavopiridolで有意な滑膜細胞増殖抑制効果など抗炎症効果が見られており, 今回我々の細胞を用いた検討では100nMの低濃度でもIL-6蛋白のdegradationが観察された(図5)。

図1にIL-6刺激による細胞シグナル伝達概念図を示す。IL-6は*de novo*急性炎症反応における重要なメディエーターとして産生され, 肝臓細胞のIL-6受容体に結合しgp130とオリゴマー複合体を形成する。さらにシグナルがJAK/Tyk キナーゼ, STAT3を介して核内に伝達し転写因子を活性化することが知られている⁴⁾。ThyL-6細胞の染色体異常として7p11, 8p11, 9q11, 16q24, 17p11, 21p11での異常が検出されたが, そのうち17p11にはgp130をコードする遺伝子が存在しており, ThyL-6細胞もgp130を介したIL-6シグナル伝達異常メカニズムの存在が示唆され(データ省略), 今後の検討を要する。

*本研究の一部は財団法人痛風研究会の研究助成金により行った。

文 献

- 1) Ronnblom L, Elkon KB : Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6 : 339-347, 2010.
- 2) Iwasaki H, Takada N, Nakamura T et al : Increased levels of macrophage colony-stimulating factor, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha in sera of patients with *Orientia tsutsugamushi* infection. *J Clin Microbiol* 35 : 3320-3322, 1997.
- 3) Takagi K, Shimizu H, Iwasaki H et al : Serum cytokine level during continuous venovenous hemofiltration in toxic shock-like syndrome due to group G beta Streptococcus bacteremia in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Scand J Infect Dis* 34 : 403-406, 2002.
- 4) Murakami M, Hibi M, Nakagawa N et al : IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260 : 1808-1810, 1993.
- 5) Moran DM, Mattocks MA, Cahill PA et al : Interleukin-6 mediates G (0) /G (1) growth arrest in hepatocellular carcinoma through a STAT 3-dependent pathway. *J Surg Res* 147 : 23-33, 2008.
- 6) Frassanito MA, Cusmai A, Iodice G et al : Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97 : 483-489, 2001.
- 7) Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G et al : Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 103 : 242-251, 2004.
- 8) Alas S, Bonavida B : Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 9 : 316-326, 2003.
- 9) Bathon JM, Cohen SB : The 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: where the rubber meets the road. *Arthritis Rheum* 59 : 757-759, 2008.
- 10) Senderowicz AM : The cell cycle as a target for cancer therapy : basic and clinical findings with

- the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *Oncologist* 7 Suppl 3 : 12-19, 2002.
- 11) Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA et al : Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 56 : 2973-2978, 1996.
 - 12) Burdette-Radoux S, Tozer RG, Lohmann RC et al : Phase II trial of flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs* 22 : 315-322, 2004.
 - 13) Grendys EC, Jr., Blessing JA, Burger R et al : A phase II evaluation of flavopiridol as second-line chemotherapy of endometrial carcinoma : a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 98 : 249-253, 2005.
 - 14) Dispenzieri A, Gertz MA, Lacy MQ et al : Flavopiridol in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 2 trial with clinical and pharmacodynamic end-points. *Haematologica* 91 : 390-393, 2006.
 - 15) Byrd JC, Lin TS, Dalton JT et al : Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109 : 399-404, 2007.
 - 16) Dickson MA, Schwartz GK : Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol* 16 : 36-43, 2009.
 - 17) Svejstrup JQ : The RNA polymerase II transcription cycle : cycling through chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1677 : 64-73, 2004.
 - 18) Hou T, Ray S, Brasier AR : The functional role of an IL-6 inducible CDK9-STAT3 complex in human gamma -fibrinogen gene expression. *J Biol Chem* 2007.
 - 19) Rapella A, Negrioli A, Melillo G et al : Flavopiridol inhibits vascular endothelial growth factor production induced by hypoxia or picolinic acid in human neuroblastoma. *Int J Cancer* 99 : 658-664, 2002.
 - 20) Inai K, Takagi K, Takimoto N et al : Multiple inflammatory cytokine-productive ThyL-6 cell line established from a patient with thymic carcinoma. *Cancer Sci* 99 : 1778-1784, 2008.
 - 21) Shimizu S, Yoshioka R, Hirose Y et al : Establishment of two interleukin 6 (B cell stimulatory factor 2/interferon beta 2) -dependent human bone marrow-derived myeloma cell lines. *J Exp Med* 169 : 339-344, 1989.
 - 22) Sedlacek HH : Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematol* 38 : 139-170, 2001.
 - 23) Shah MA, Schwartz GK : Cyclin-dependent kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 21 : 145-170, 2003.
 - 24) Nishimoto N, Kishimoto T : Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 : 619-626, 2006.
 - 25) Sekine C, Sugihara T, Miyake S et al : Successful treatment of animal models of rheumatoid arthritis with small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Immunol* 180 : 1954-1961, 2008.
 - 26) Hou T, Ray S, Brasier AR : The functional role of an interleukin 6-inducible CDK9-STAT3 complex in human gamma-fibrinogen gene expression. *J Biol Chem* 282 : 37091-37102, 2007.

Flavopiridol inhibits interleukin-6 secretion via degradation of RNA polymerase II in multi-cytokine-producing ThyL-6 cells originally established from patient with thymus cancer

Kazutaka Takagi¹⁾Kunihiro Inai²⁾Nobuhiro Naiki²⁾Hiromichi Iwasaki¹⁾Takanori Ueda¹⁾

Interleukin-6 (IL-6), an inflammatory cytokine produced by various cells, regulates production of acute-phase proteins in liver, and induces proliferation in IL-6-dependent cells. After IL-6 binds to an IL-6 receptor (IL-6R) on the target cell, the signal activates gp-130-associated Janus tyrosine kinase (Jak), which then stimulates transcription, cell proliferation and cytokine production via signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3). Monoclonal anti-IL-6R antibody therapy (tocilizumab[®], humanized monoclonal antibody) has recently been found to be effective for rheumatoid arthritis (RA) and some IL-6-dependent cancers, and about 30% of RA patients have achieved remission by combination use with methotrexate. Flavopiridol, a semi-synthetic flavonoid isolated from *Dysoxylum binectariferum*, is

known to be an inhibitor of pan-cyclin-dependent kinases (CDKs). In this paper, we demonstrate that Flavopiridol inhibits IL-6 production at concentrations below 100 nM in inflammatory cytokine-producing cells (ThyL-6) originally established from a 57-year-old patient with thymus cancer. Moreover, Flavopiridol was able to inhibit RNA polymerase II phosphorylation, which is necessary for CDK-7 or CDK-9 activation, thus suggesting that this flavonoid drug can inhibit transcription activity at clinically achievable incubation times and concentrations. In conclusion, Flavopiridol is a novel therapeutic tool for IL-6-dependent cancer, and is an anti-inflammation agent for conventional therapy-resistant rheumatological diseases.

1) Hematology and Oncology Division, Faculty of Medical Science, University of Fukui.

2) Division of Molecular Pathology, Faculty of Medical Science, University of Fukui.